

<http://dx.doi.org/10.15202/10.15202.2014v19n38p9>

ALVOS MOLECULARES PROMISSORES PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS

João Batista Teixeira de Souza¹

RESUMO

O objetivo principal deste estudo foi o levantamento bibliográfico sobre os alvos moleculares mais promissores para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos. Vários artigos científicos foram consultados, em diferentes bancos de dados, no período entre janeiro e agosto de 2014. Nos últimos anos, a doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, transformou-se em um enorme problema de saúde pública rural e urbano mundial, devido aos fenômenos das migrações regionais e internacionais, produzidos pela globalização. O sequenciamento do genoma do *T. cruzi* levou à descoberta de novos alvos moleculares neste parasito, tornando o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas muito mais objetivo. Uma grande quantidade de novas drogas tem sido testada contra estes novos alvos moleculares do *T. cruzi*, provando possuírem atividades tripanocidas. O composto 6, o composto (S)-7 e as defensinas humanas são drogas promissoras para serem testadas na pesquisa pré-clínica. Apenas o composto K777 passou pelos testes pré-clínicos e está pronto para ser testado na fase clínica. Os compostos alopurinol, posaconazol e o itraconazol não foram aprovados na fase clínica para entrarem no mercado. A prevenção e o controle da doença de Chagas são as melhores alternativas para ajudar a diminuir o número de pacientes chagásicos no mundo atualmente.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Alvos moleculares. Novas drogas antichagásicas.

PROMISING MOLECULAR TARGETS FOR THE DEVELOPMENT OF NEW ANTICHAGASIC DRUGS

ABSTRACT

The aim of this study was the survey of the literature on the most promising molecular targets for the development of new antichagasic drugs. Several scientific articles were consulted in different databases, between January and August 2014. In recent years, Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, turned into a huge world public health problem in rural and urban areas, due to the phenomena of regionals and international migratios, produced by globalization. The sequencing of the *T. cruzi* genome led to the discovery of new molecular targets in this parasite, making the development of new drugs against Chagas disease much more objective. Several new drugs have been tested against these new molecular targets of *T. cruzi*, proving that they have trypanocidal activities. Compound 6, compound (S) -7 and human defensins are promising

¹ Especialista em Pesquisa Pré-clínica e Clínica pelo Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM), Rio de Janeiro, Brasil
Mestre em Farmacologia e Biotecnologia pela Sheffield Hallam University, Sheffield, Inglaterra
jbtsouza@gmail.com

drugs to be tested in pre-clinical research. Only the K777 compound passed through preclinical testing and is ready to be tested in clinical phase. The allopurinol, posaconazole and itraconazole compounds were not approved in clinical phase to enter the market. The prevention and control of Chagas disease are the best alternatives to help to reduce the number of patients with Chagas disease in the world currently.

Keywords: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. Molecular targets. New antichagasic drugs.

1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi*, um protozoário, é o agente etiológico da doença de Chagas. Esta doença é uma antroponose frequente no continente americano, principalmente, na América Latina. Atualmente, os fatores da epidemiologia da doença de Chagas são bem conhecidos e delineados. Apesar de nas cidades ocorrer a transmissão por meio da transfusão sanguínea, a transmissão pelos dejetos de várias espécies de triatomíneo (inseto popularmente conhecido como barbeiro) possui maior importância epidemiológica. O estudo da distribuição geográfica e o comportamento da doença de Chagas permitem-nos inferir que se trata de uma doença exclusiva de insetos triatomíneos silvestres e que, posteriormente, passou para os seres humanos na medida em que estes destruíram o ciclo silvestre natural (NEVES *et al.*, 2005). Portanto, pode-se afirmar que a doença de Chagas é uma doença típica da degradação ambiental.

O objetivo principal deste estudo foi o levantamento bibliográfico sobre os novos alvos moleculares mais promissores para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos. Vários artigos científicos foram consultados, em diferentes bancos de dados, no período de janeiro a agosto de 2014.

2 A HISTÓRIA DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é uma das patologias de maior prevalência no continente americano. Em 2009, foi comemorado o centenário do descobrimento da doença, que foi considerado um enorme feito científico realizado por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, ocorrido em 1909, durante a sua expedição à cidade de Lassance, localizada no interior de Minas Gerais. O descobrimento da doença de Chagas é considerado um marco na história da medicina brasileira, por se tratar de uma tripla descoberta, em que Carlos Chagas descobriu não apenas o inseto vetor, popularmente conhecido como barbeiro, o agente etiológico da doença, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, como ainda descreveu a patologia da doença. Considerando o fato de que Carlos Chagas efetuou suas investigações destacando os fundamentos da tripanossomíase, individualmente, sem os recursos modernos disponíveis na atualidade, os méritos desta descoberta são ainda mais evidentes (MALAFAIA; RODRIGUES, 2010).

3 A DOENÇA DE CHAGAS NO MUNDO

No continente americano, a distribuição geográfica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* vai desde o Sul dos Estados Unidos até o Sul da Argentina e Chile. A figura 1 mostra a distribuição desta doença na América Latina destacando as zonas endêmicas do Brasil (COURA; DIAS, 2009).

Figura 1: Distribuição da doença de Chagas na América Latina



Fonte: Coura e Dias (2009).

Estima-se que cerca de 130 espécies de insetos são vetores potenciais do *Trypanosoma cruzi*. Mais de 52 espécies de triatomas foram descritas no Brasil, sendo que 5 delas têm importância epidemiológica, uma vez que são consideradas espécies domesticadas: *T. infestans*, *T. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*. As outras 47 espécies são selvagens e mantêm um ciclo natural apenas com mamíferos selvagens (COURA; DIAS, 2009).

Aproximadamente 100 espécies de animais selvagens e domésticos são reservatórios do *Trypanosoma cruzi*, sendo potenciais vetores de transmissão da infecção para seres humanos. Entre estas espécies estão: macacos, morcegos, roedores, marsupiais, ratos, gatos, cachorros, porcos, cabras etc. (COURA; DIAS, 2009).

A doença de Chagas é considerada um dos principais problemas socioeconômicos e de saúde pública da América Latina. Esta doença negligenciada afeta 18 milhões de pessoas, principalmente, desde o Sul dos Estados Unidos até o Sul da Argentina, causando cerca de 50.000 mortes por ano e ameaçando 100 milhões de pessoas de contaminação. São estimados 300 mil novos casos da doença por ano (DIAS *et al.*, 2009)

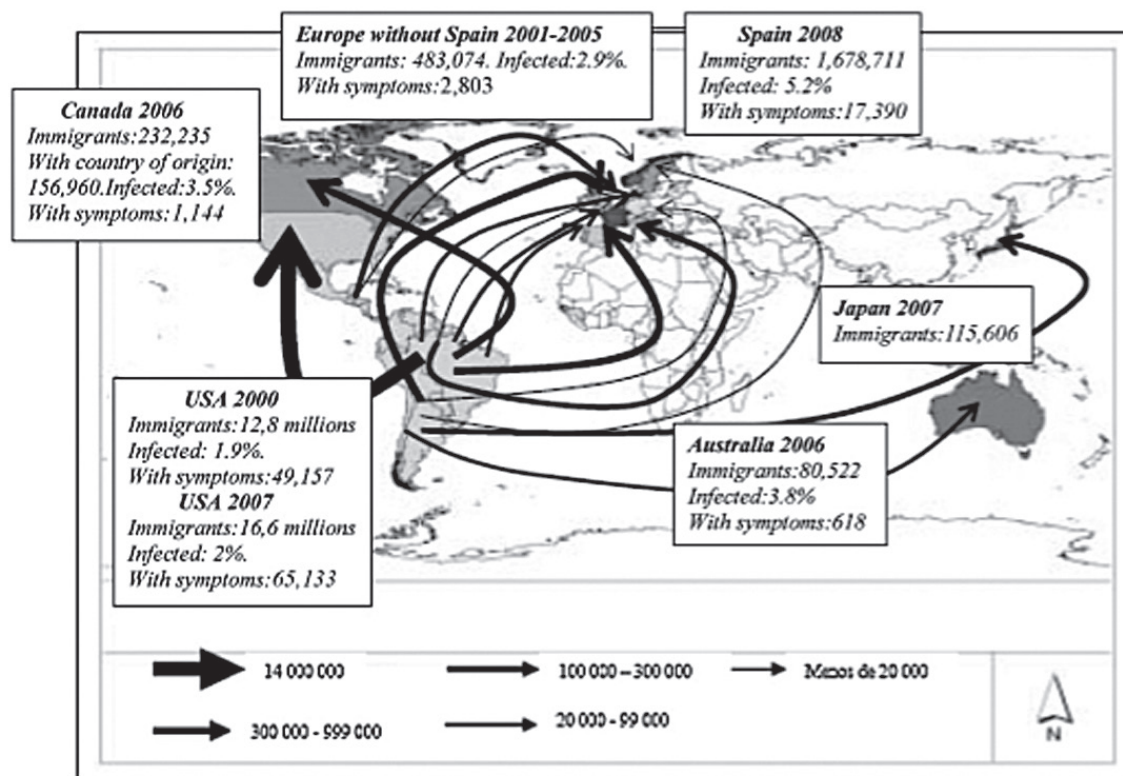
Embora tenham sido alcançados avanços significativos em relação à redução da transmissão da doença de Chagas por vetores da espécie triatoma, via combate químico e melhoria dos domicílios, a maioria das infecções humanas, na América Latina, ainda ocorre via contato da pele e mucosas com fezes ou urina de insetos da espécie triatoma contaminados com o *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que nos países da América do Sul de 1 a 12% dos recém-nascidos de mães infectadas podem estar infectados com este protozoário. Há também um potencial de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* por meio de transfusão de sangue e derivados, bem como

pela doação de órgãos contaminados. Problemas políticos e econômicos nos países endêmicos têm aumentado também a imigração de indivíduos contaminados para os países desenvolvidos, tornando a doença passível de transmissão também nestes países (SCHMUNIS, 2007).

Desde 1960 a estagnação econômica e problemas políticos têm estimulado a migração da América Latina para países desenvolvidos, principalmente para os Estados Unidos, países da Europa, Canadá, Austrália e Japão. A doação de sangue, a doação de órgãos, a infecção congênita e pelo leite materno são os meios primários de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, nos países de destino dos imigrantes (SCHMUNIS; YADON, 2010).

A figura 2 mostra o fluxo da migração da América Latina para os países de destino. Esta figura mostra também o número de imigrantes nos países de destino, com as respectivas percentagens de infectados com o *Trypanosoma cruzi* e respectivos números de chagásicos sintomáticos.

Figura 2: Fluxo da migração dos países endêmicos e estimativa do número de infectados nos países de destino



Fonte: Schmunis e Yadon (2010).

Como pode ser visto pelos dados apresentados, a doença de Chagas deixou de ser uma doença apenas do meio rural latino-americano e se tornou um enorme problema de saúde pública rural e urbano mundial, devido aos fenômenos das migrações regionais campo-cidade e das migrações internacionais dos últimos anos produzidas pela globalização.

4 A HISTÓRIA DO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS

A longa história do desenvolvimento de fármacos antichagásicos pode ser dividida em três períodos principais. O primeiro período refere-se ao estágio inicial da descoberta da doença, que começa em 1909 e termina em 1935 com a morte de Carlos Chagas. Este período é marcado pelo lançamento do "Manual de Doenças Tropicais e Infectuosas", em 1935, escrito por Carlos Chagas em coautoria com seu filho Evandro Chagas. O segundo período vai de 1936 a 1960, e é marcado pela avaliação biológica de inúmeras substâncias, misturas de componentes e extratos, as quais produziram resultados controversos e de significados clínicos questionáveis. O último período começa em 1961 e é caracterizado por pesquisas que mostraram, por meio de modelos experimentais de infecção pelo protozoário causador da doença de Chagas em camundongos, a eficácia de alguns compostos, tal como o nitrofurazona (DIAS *et al.*, 2009).

Atualmente, o arsenal de medicamentos disponível para combater a terrível doença de Chagas é muito pequeno. Apenas o benznidazol é usado na terapia desta doença, com baixa eficiência. Isto reforça a urgente necessidade de investimentos na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, que sejam mais eficazes e aumentem as opções de tratamento para as diferentes cepas do *T. cruzi* existentes no mundo.

5 A BUSCA POR NOVOS ALVOS MOLECULARES NO *T. CRUZI*

Nos últimos anos, foram obtidos avanços significativos sobre os aspectos biológicos, genéticos e evolucionários do *T. cruzi*. O sequenciamento genético do genoma deste parasito permitiu a identificação de diversos alvos macro e micromoleculares promissores, sendo que a maioria constitui-se em enzimas. A seguir são apresentados os alvos moleculares mais promissores para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos encontrados neste levantamento bibliográfico.

5.1 Proteinases

São enzimas especializadas em quebrar ligações peptídicas entre os aminoácidos de proteínas e peptídeos. As proteinases são encontradas em bactérias, protozoários, plantas e animais. O *Trypanosoma cruzi* possui uma proteinase denominada cruzipaina. Tal enzima proteolítica está envolvida nos mecanismos de defesa do parasito frente à resposta imune do hospedeiro por hidrolisar os anticorpos do hospedeiro; participar da penetração da forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* nas células humanas; também, está envolvida na diferenciação do ciclo de vida deste parasito dentro da célula do homem, como por exemplo, a transformação da forma tripomastigota em amastigota (STOKA *et al.*, 1995). A cruzipaina é uma proteinase abundante do *T. cruzi* e tem sido muito estudada como alvo de novos fármacos antichagásicos, o que ocasionou a descoberta de vários e potentes inibidores desta enzima (DUSCHAK; COUTO, 2007).

5.2 Biossíntese de Esteróis

Os esteróis são estruturas essenciais das membranas celulares de plantas e animais. Eles são também precursores de vários hormônios e da vitamina D e fundamentais para o crescimento celular. No ser humano, o principal esterol da membrana celular é o colesterol; porém, o ergosterol é o principal esterol para o crescimento do *T. cruzi*, e é sintetizado por enzimas específicas deste parasito. A depleção do ergosterol causa a morte celular de tripanosomas como consequência do rompimento da membrana celular. Então, várias enzimas da via de biossíntese do ergosterol são alvos bastantes atrativos para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos (DOCAMPO; SCHMUNIS, 1997).

5.3 Biossíntese de Poli-isoprenóides

A farnesilpirofosfato sintase (FPPS), em protozoários patogênicos, é a enzima que sintetiza o farnesilpirofosfato, a qual marca o ponto de ramificação da síntese de uma variedade de esteróis e outros isoprenóides essenciais para os protozoários. O gene TcFPPS, que codifica a enzima referida no *T. cruzi*, foi clonada, sequenciada e expressa, tornando-se um alvo a mais para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos (DUSCHAK; COUTO, 2007).

A proteína farnesiltransferase (PFT) é uma enzima que catalisa a transferência de um resíduo farnesil de um farnesilpirofosfato para grupo tiol de uma cisteína da cadeia de uma proteína que carrega no terminal C, a sequência chamada CAAX. Tal proteína está envolvida na transdução de sinal e ancoragem de proteína a membranas celulares. A PFT do *T. cruzi* foi clonada e mostrou diferenças quando comparada com a mesma enzima de mamíferos, validando-a como alvo para quimioterapia tripanossomicida (GELB; VAN VOOHRIS; BUCKNER, 2003).

5.4 Metabolismo dependente de grupos tióis

Os tióis tripanotiona, homotripanotiona, glutathione e ovotiol são os principais mecanismos de defesa do *T. cruzi* contra o estresse oxidativo. O agente causador da doença de Chagas é deficiente de outros mecanismos de defesa contra radicais livres. Assim, uma redução nos níveis dos tióis antioxidantes deste parasita o tornaria altamente suscetível aos efeitos deletérios dos radicais livres. Enzimas relacionadas com a biossíntese de tióis, no *T. cruzi*, tais como a enzima tripanotiona redutase e tripanotiona sintetase, têm sido bastante estudadas como alvos no desenvolvimento de fármacos tripanossomicidas. A função da primeira enzima é manter os níveis de tripanotiona reduzidos e a segunda enzima é responsável pela adição do composto ao substrato glutathionil esperimidina, formando tripanotiona (DIAS *et al.*, 2009).

5.5 Via glicolítica

É bem conhecido que o *T. cruzi* é altamente dependente da via glicolítica para a obtenção de energia pela produção de ATP. Desta forma, a inibição de enzimas desta via em tripanosomas funciona como um alvo atrativo para o desenvolvimento de agentes antichagásicos (ANGEL *et al.*, 1987). Três dessas enzimas têm sido bastante estudadas: a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

(GAPDH), a hexoquinase e a fosfofrutoquinase. A GAPDH é uma enzima que catalisa a conversão do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato; a hexoquinase converte o ATP em ADP e a fosfofrutoquinase transfere irreversivelmente um fosfato do ATP a frutose-6-fosfato (DIAS *et al.*, 2009).

5.6 Transferência de Ácido Siálico

O *T. cruzi* não é capaz de sintetizar seu próprio ácido siálico. Porém, é capaz de obtê-lo do seu próprio hospedeiro mamífero, utilizando a atividade de sua enzima trans-sialidase para transferir moléculas de ácido siálico do seu hospedeiro para moléculas de mucinas aceptoras presentes na superfície da membrana deste protozoário. Acredita-se que a ação da trans-sialidase é fundamental para a sobrevivência do *T. cruzi* e para a sua invasão na célula do hospedeiro (FRASCH, 2000), o que torna esta enzima um alvo macromolecular promissor para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos tripanossomicidas.

5.7 Membranas celulares e organelas celulares

A membrana celular do *T. cruzi* é um excelente alvo para o desenvolvimento de agentes antichagásicos, devido ao fato de a composição de lipídeos desta organela ser diferente da de seres humanos.

A síntese de vitamina C é outro alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos contra a doença de Chagas, devido ao fato de o *T. cruzi* ser capaz de sintetizar a vitamina C em seu glicosoma e os seres humanos não possuem a capacidade de sintetizar tal vitamina (WILKINSON *et al.*, 2005).

O cinetoplasto e o núcleo celular do *T. cruzi* também são alvos promissores para o desenvolvimento de fármacos tripanossomicidas. As DNA topoisomerases são enzimas essenciais para a classe dos tripanosomas cinetoplastidas. Tais enzimas possuem um papel essencial na biossíntese de ácido nucléico e na sobrevivência celular pela modificação da topologia do DNA. Em cinetoplastidas, as topoisomerases estão envolvidas no metabolismo do DNA nuclear e mitocondrial. Pelo papel central que as topoisomerases têm também na replicação do cinetoplasto, elas se tornaram o foco de estudos da Biologia Molecular e Celular como alvos de novas quimioterapias antiparasíticas, particularmente, a topoisomerase II. Vários inibidores da topoisomerase II do DNA de bactérias mostraram ser também efetivos contra o *T. cruzi*, produzindo estragos no cinetoplasto e no núcleo de formas epimastigotas e inibindo os processos de proliferação e diferenciação; mostrando que o cinetoplasto e núcleo do *T. cruzi* podem ser alvos de novas drogas (GONZALES-PERDOMO *et al.*, 1990).

5.8 Metabolismos da poliamina e vias de transporte

Em parasitos do reino protozoa, o metabolismo da poliamina e vias de transporte são alvos muito interessantes para novas quimioterapias antiparasitárias. As poliaminas estão envolvidas em várias funções celulares como, por exemplo: condensação da cromatina; transições conformacionais do DNA; modificações pós-tradução de proteínas etc. No *T. cruzi*, a poliamina

espermidina forma uma parte do tripanotiona, que é um membro essencial do metabolismo do ditiol redox. Isto contribui com a manutenção de um ambiente intracelular mais amigável. As poliaminas desempenham um papel importante no crescimento e diferenciação celular do parasito e o metabolismo desta proteína tem atraído uma atenção considerável como alvo quimioterapêutico em infecções parasitárias (ARIYANAYAGAM; FAIRLAMB, 1997).

5.9 Proteínas cinases

São excelentes alvos para o desenvolvimento de novas drogas, incluindo diversas doenças de animais e humanas, tais como as causadas por protozoários. O sequenciamento do genoma do *T. cruzi* irá permitir a análise do seu cinoma, e as diferenças com o cinoma humano permitirão o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos antichagásicos (NAULA; PARSONS; MOTTRAM, 2005).

6 A TRIAGEM POR DROGAS CONTRA OS NOVOS ALVOS MOLECULARES DO *T. CRUZI*

Nos últimos anos, muitas drogas foram testadas contra os novos alvos moleculares do agente etiológico da doença de Chagas. Muitas delas apresentaram atividades promissoras contra este protozoário. A seguir segue uma lista das drogas mais promissoras direcionadas contra estes novos alvos moleculares encontradas nesta pesquisa.

6.1 Inibidores de proteinases

Inibidores de proteinases são substâncias que inibem a ação das enzimas proteinases, as quais são enzimas proteolíticas que quebram as ligações peptídicas de peptídeos e proteínas (OLIVEIRA; XAVIER-FILHO; SALES, 2003).

A inibidora de proteinase chamada cistatina A consiste em uma proteína de 11 kDa, sendo uma cadeia simples com ação intracelular (BUTLER *et al.*, 2011). Em um estudo executado pelo grupo de Stoka *et al.* (1995) foi demonstrado, *in vitro*, que a cistatina A é uma potente inibidora da cruzipaína do *Trypanosoma cruzi*. Este estudo foi executado a uma temperatura de 37 °C e a um PH de 6.5; e foram obtidos os seguintes parâmetros: Kd: 72; Kass: 3,4; Kdiss: 2,5; mostrando que a cistatina A possui um bom potencial como possível agente terapêutico no tratamento da doença de Chagas; principalmente pelo fato de ela agir intracelularmente, o que poderia alvejar as formas do *T. cruzi* do meio intracelular.

O pepdil diazometano é um inibidor que mostrou forte inibição da cruzipaína do *T. cruzi* quando foi incluída uma sequência da proteína cistatina A, diferentemente dos homólogos de mamíferos; provavelmente devido a diferenças nas topologias dos sítios de ligação (LALMANACH *et al.*, 1996)

Em relação aos inibidores peptidil sulfônicos, ensaios *in vivo* demonstraram que derivados peptídicos, especialmente o dipeptidil vinil sulfona, foram capaz de curar, completamente, ratos de inoculação letal aguda do *T. cruzi*, provavelmente devido à acumulação da cruzipaína deste parasito no complexo de golgi (ENGEL *et al.*, 1998).

6.2 Inibidores da via de biossíntese de esteróis

São moléculas que inibem a ação das enzimas envolvidas na produção do ergosterol. Como consequência, a depleção do ergosterol causa o rompimento da membrana celular e a morte deste parasito (DOCAMPO; SCHMUNIS, 1997).

As drogas azólicas (inibidores azólicos), como o cetoconazol e o itraconazol, alvejam a enzima c14- α -demetilase que está envolvida na biossíntese de ergosterol, provocando a redução da produção deste lipídeo componente da membrana celular do *T. cruzi*. Foi relatado que derivados do triazol, tais como o posaconazol, (SCH56592, Schering Plough Research Institute); D0870 (Astra-Zeneca Pharmaceuticals); e TAK-187 (Takeda Chemical Company) foram capazes de induzir a cura em modelos de animais com doença de Chagas aguda e crônica sem nenhum efeito colateral nos hospedeiros (URBINA; PAYARES; MOLINA, 1996). O fluconazol e o albaconazol reduziram ou preveniram os sintomas da fase crônica da doença de Chagas em modelos animais chagásicos agudos e crônicos; sendo que o albaconazol se mostrou o mais potente composto testado contra o *T. cruzi* (URBINA *et al.*, 1996). O ravuconazol se mostrou o mais promissor candidato para a pesquisa clínica devido à sua atividade tripanossomicida *in vitro* e *in vivo* (URBINA; DOCAMPO, 2003).

Foi relatado que inibidores baseados em íons piridíneos, tais como íons N-ALKYL- e o N-prenilpiridíneo, possuem potente atividade contra o *T. cruzi* por inibir a biossíntese do ergosterol neste parasito. Uma série de compostos foi desenhada para inibir a enzima oxidoesqualeno ciclase (OSC), componente da via de biossíntese do ergosterol. Estes compostos foram testados em mamíferos e se mostraram altamente ativos contra formas tripomastigotas (BUCKNER *et al.*, 2001).

Usando uma enzima OSC recombinante do *T. cruzi* expresso em levedura, 19 inibidores da via de biossíntese do ergosterol derivados do feniltiovinil foram testados. Muitos inibidores da OSC experimental mostraram IC50 comparáveis com o OSC do *T. cruzi*, porém, alguns inibidores derivados do feniltiovinil mostraram ser 10-100 vezes mais efetivos sobre esta enzima do *T. cruzi* que as enzimas controle (OLIARO-BOSSO *et al.*, 2005).

Em relação aos inibidores baseados na alilamina, a alilamina terbinafina inibe a enzima da via de biossíntese do ergosterol chamada esqualeno epoxidase. Foi mostrado que este inibidor possui propriedades sinérgicas com o cetoconazol contra culturas do *T. cruzi* (URBINA, 1997).

Dois compostos altamente otimizados e promissores para serem testados na pesquisa pré-clínica foram sintetizados, são os Inibidores da enzima CYP51. Estes dois compostos, chamados simplesmente de composto 6 e composto (S)-7, são compostos inibidores da enzima CYP51 do *T. cruzi*, a qual está envolvida na biossíntese de esteróis deste parasito. Estes dois compostos são potentes inibidores do *T. cruzi in vitro*; eles não apresentaram citotoxicidade e não causaram qualquer efeito colateral em modelos de camundongos nos testes *in vivo* (KEENAN *et al.*, 2013).

6.3 Inibidores da via de biossíntese de poli-isoprenóides

Inibidores da via de biossíntese de poli-isoprenóides são compostos que inibem a ação das enzimas envolvidas na biossíntese de poli-isoprenóides.

A enzima farnesilpicrofosfato sintase foi inibida por bisfotonatos contendo nitrogênio, tais como o risedronato e o pamidronato, que causaram a baixa da parasitemia do *T. cruzi* em

camundongos infectados e a inibição da replicação de formas amastigotas intracelulares *in vitro*; tornando estes compostos em substâncias promissoras no desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos (URBINA, 1999).

Diversos inibidores não-tiol da enzima farnesil transferase, baseados na benzofenona, foram testados contra o *T. cruzi*, *in vitro* e *in vivo*. Os derivados R-fenilalanina e o N-propilpiperazinil mostraram as mais promissoras atividades *in vitro*, com valores de IC₅₀ na classe do nM. Estes inibidores não apresentaram nenhuma citotoxicidade às células. Nos testes *in vivo*, a taxa de sobrevivência dos animais infectados foi de 60 a 80%, 115 dias depois da infecção (ESTEVA; KETTLER; MAIDANA, 2005).

6.4 Inibidores da Via de Biossíntese de Grupos Tióis

Inibidores da via de biossíntese de grupos tióis são compostos que inibem enzimas envolvidas na biossíntese de tióis antioxidantes, tais como a tripanotiona, homotripanotiona, glutatona e ovotiol, que são os principais mecanismos de defesa do *T. cruzi* contra o estresse oxidativo dos radicais livres.

O composto organometálico platina II, usado na terapia do câncer, mostrou-se ser também um potente inibidor da enzima tripanotiona redutase do *T. cruzi*, com atividade tripanossomicida *in vitro* e *in vivo* (FARREL; WILLIAMSON; MCLAREN, 1984). Também foi relatado que a complexação de outros metais, como o rutênio II, III e o ródio II com drogas antiparasitárias, tais como o cetoconazol, resolveram o problema da resistência às drogas de protozoários (SANCHES-DELGADO *et al.*, 1993).

A fenotiazina e compostos relacionados são drogas tricíclicas. Elas possuem atividades tripanossomicidas sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*. A clomipramina e a tioridazina mostraram-se eficazes no tratamento de camundongos infectados com *T. cruzi* experimental (RIVAROLA; PAGLINI OLIVA, 2002).

A dafnolina e a cefarantina são alcaloides inibidores da tripanotiona redutase. A dafnolina levou a uma redução muito boa da parasitemia e a uma taxa de cura elevada em camundongos infectados com o *T. cruzi*; e, em 70% dos camundongos com doença de Chagas crônica nenhum protozoário foi encontrado (FOURNET; ROJAS DE ARIAS; FERREIRA, 2000).

O design dos compostos derivados 5-nitrofuril, os quais combinam no mesmo composto o reconhecido grupo 5-nitrofuril que é um promotor de estresse oxidativo, e cadeias laterais que podem bloquear a tripanotiona redutase provaram possuir atividades contra formas epimastigotas do *T. cruzi* em comparação ao medicamento controle nifurtimox (AGUIRRE *et al.*, 2006).

6.5 Inibidores da via glicolítica

O *T. cruzi* é dependente da via glicolítica para a obtenção de energia por meio da produção de ATP. Assim, inibir as enzimas desta via, em tripanossomas, torna-se atrativo para o desenvolvimento de agentes antichagásicos (ANGEL *et al.*, 1987).

O composto 3', 4', 5', 5, 7-penta-metoxiflavona (flavonoides), isolado da fruta de *Neoraputia magnifica*, mostrou possuir uma alta atividade inibitória contra a GAPDH do *T. cruzi* (TOMAZELA; PUPO; PASSADOR, 2000).

As moléculas piperonilcumarinas foram projetadas como inibidoras da gGAPDH do *T. cruzi* e são baseadas em estruturas de produtos naturais identificados anteriormente. Os derivados mais ativos contra o agente causador da doença de Chagas continham anéis heterocíclicos na posição 6 (DE MARCHI; CASTILLO; NASCIMENTO, 2004).

Foi relatado que análogos do Bisfosfonatos não-hidrolisáveis provaram ser potentes inibidores da hexoquinase do *T. cruzi*. O composto com a mais alta atividade e seletividade contra o hexoquinase deste parasita exibiu efetividade de IC₅₀ a uma dose de 2.2 μ M contra formas amastigotas intracelulares deste parasita (HUDOCK; SANZ-RODRIGUES; SONG, 2006).

6.6 Inibidores da transferência de Ácido Siálico

O *T. cruzi* não possui a capacidade de sintetizar seu próprio ácido siálico. Por isso, ele desenvolveu a capacidade de obtê-lo do seu próprio hospedeiro mamífero usando a atividade de sua enzima trans-sialidase para transferir moléculas de ácido siálico do seu hospedeiro para moléculas de mucinasceptoras presentes na superfície da membrana deste protozoário. Especula-se que a ação da trans-sialidase é fundamental para a sobrevivência do *T. cruzi* e para a sua invasão na célula do hospedeiro (FRASCH, 2000). A inibição desta enzima é um alvo macromolecular promissor para o desenvolvimento de agentes inibidores da transferência de ácido siálico.

O composto fosfonato monoéster sialil-miméticos-ciclohexeno foi testado contra sialidases bacterianas e parasitárias e mostrou possuir propriedades inibitórias promissoras (STREICHER; BUSSE, 2006).

O composto piperidinas N-substituídas foi patenteado por Horenstein and Parr da Universidade da Flórida, os quais reivindicam que esta molécula poderia ser usada no tratamento de infecções virais, bacterianas e tripanossomicidas (HORENSTEIN; PARR, 1999).

6.7 Compostos Direcionados às Membranas Celulares e Organelas Celulares

As defensinas são peptídeos antimicrobianos que alvejam membranas e organelas celulares de micróbios. Elas evoluíram para ter uma função central na defesa do hospedeiro contra diversos tipos de microorganismos (SELSED; QUELLETTE, 2005). Em um estudo executado pelo grupo de Madison *et al.* (2007) ficou provado que a defensina humana α -1 foi capaz de matar quase 100% das formas tripomastigotas e amastigotas *in vitro* a uma concentração entre 25 e 35 μ M. Neste mesmo estudo foi demonstrado que a defensina humana α -1 destruiu o *trypanosoma cruzi* pela formação de poros na membrana do parasito, penetração no interior da célula, e fragmentação do DNA nuclear e do kDNA do parasito. Este estudo também demonstrou que a defensina humana α -1 foi capaz de matar, em 24 horas, 35% das formas tripomastigotas presentes em sangue coletado de ratos infectados, a uma concentração de 25 μ M e incubação a 4 °C. Este grupo também demonstrou que a incubação da forma tripomastigota com uma dose subletal de 3,7 μ M da defensina humana α -1, seguida pela sua exposição às células humanas epiteliais, foi capaz de reduzir drasticamente a habilidade do *trypanosoma cruzi* de se ligar e entrar nas células hospedeiras a 2h e 24h e de se multiplicar como forma amastigotas dentro das células humanas epiteliais a 48 e 72 h em comparação a controles positivos.

O *T. cruzi* é sensível a derivados da quinolona, provavelmente pela inibição de topoisomerasas. A camptotecina foi testada *in vitro* e mostrou-se ativa contra este protozoário, causando o rompimento do DNA nuclear e mitocondrial deste parasita (BODLEY; SHAPIRO, 1995).

Por volta de vinte moléculas dicatiônicas contendo diguanidina ou grupos catiônicos da amidina inversa (guanidina dicatiônica e derivados da amidina inversa) foram testadas contra o *T. cruzi*, *in vitro*. Os compostos mais promissores foram os pertencentes ao grupo da amidina inversa, sendo que alguns deles exibiram valores de IC50 de menos de 1 µM (STEPHENS; BRUN; SALEN, 2003). Outros ligantes destas classes, tais como benzimidazol, colchicina e vimblastina, mostraram atividades contra o *T. cruzi* por interação específica com a tubulina deste protozoário (OCHOLA; PRICHARD; LUBEGA, 2002).

O design de inibidores de topoisomerasas mostrou-se uma alternativa promissora no desenvolvimento de novos fármacos citotóxicos. Há no mercado alguns agentes antineoplásicos que atuam como inibidores da topoisomerase I e II: irinotecano (Camptosar, da Pfiser); topotecana (Hycamtin, da GlaxoSmithKline); etoposida e teniposida (Vepesid e Vumon, respectivamente, da Bristol-MyersSquib). As fluoroquinolonas, acridinas e antraciclinas são inibidoras de topoisomerasas que exibiram bons resultados contra formas tripomastigotas do *T. cruzi* (DIAS *et al.*, 2009).

6.8 Metabolismos da poliamina e vias de transporte

O *T. cruzi* mostrou-se suscetível ao composto difluormetilarginina (DFMA), que é um inibidor da descarboxilase arginina; a qual é uma enzima envolvida no metabolismo da poliamina (MAJUMDER *et al.*, 1992).

6.9 Inibidores de proteínas cinases

Inibidores de proteínas cinases são compostos que inibem a ação destas enzimas presentes no *T. cruzi*. O inibidor staurosporina da serina cinase do *T. cruzi* foi testada contra o crescimento e a ultraestrutura de formas epimastigotas deste parasito e se mostrou ser a mais efetiva das inibidoras de proteínas cinases conhecidas depois de 24 horas de tratamento (BRAGA; SOUZA, 2006).

O composto Genisteína também foi testado contra formas epimastigotas do *T. cruzi* e produziu uma inibição entre 60 e 70% no crescimento deste protozoário (BRAGA; SOUZA, 2006).

O composto Wortmanina também foi testado contra formas epimastigotas do agente causador da doença de Chagas; com um IC 50 na ordem de mM (BRAGA; SOUZA, 2006).

7 A PESQUISA PRÉ-CLÍNICA E OS NOVOS ALVOS MOLECULARES DO *T. CRUZI*

Pouquíssimas drogas, cuja triagem apresentou atividades tripanossomicidas, nos últimos anos, contra os novos alvos moleculares do *T. cruzi*, conseguiram avançar para a pesquisa pré-clínica, como candidatas a novos fármacos. Por um lado, isso foi consequência da falta de protocolos padronizados para a triagem de novas drogas com atividades contra o *T. cruzi*. Por outro lado, isso foi consequência da falta de investimentos nesta área de pesquisa.

7.1 Inibidores de proteinases

Segundo o grupo de cientistas do Centro Sandler da Universidade da Califórnia USA, o inibidor da cruzipaina (proteinase) do *T. cruzi*, chamado vinil sulfona K777, é agora um candidato a entrar na primeira fase da pesquisa clínica. De acordo com este grupo de pesquisadores, o K777 foi submetido a todos os testes em roedores, cachorros e primatas conforme avaliação pré-clínica exigida pela Food and Drug Administration (FDA). A dose máxima tolerada encontrada por estes pesquisadores estaria acima de 150 mg/kg/dia e a dose NOAEL (nível de nenhum efeito adverso) seria aproximadamente de 50 mg/kg/dia. Usando escalas alométricas para estimar a dose ideal equivalente em humanos, foi previsto que uma dose oral por volta de 10 mg/kg durante 14-30 dias seria um regime terapêutico efetivo para tratar a doença de Chagas com este inibidor de proteinase. Foi proposta a condução da fase I da pesquisa clínica para a avaliação da segurança, da tolerabilidade e da farmacocinética depois de uma dose única em pacientes saudáveis, nos Estados Unidos (MCKERROW *et al.*, 2009).

7.2 Inibidores da enzima CYP51

Dois compostos altamente otimizados e promissores para serem testados na pesquisa pré-clínica foram sintetizados. Estes dois compostos, chamados simplesmente de composto 6 e composto (S)-7, são compostos inibidores da enzima CYP51 do *T. cruzi*, a qual está envolvida na biossíntese de esteróis deste parasito. Estes dois compostos são potentes inibidores do *T. cruzi in vitro*; eles não apresentaram citotoxicidade e não causaram qualquer efeito colateral em modelos de camundongos nos testes *in vivo* (KEENAN *et al.*, 2013). Estes dois compostos foram aprovados em todos os testes recomendados pelo programa da Fiocruz e da DNDi para o desenvolvimento de novas drogas contra a doença de Chagas e estão prontos para entrarem na fase pré-clínica.

8 A PESQUISA CLÍNICA E OS NOVOS ALVOS MOLECULARES DO *T. CRUZI*

Pouquíssimos candidatos a fármacos antichagásicos foram testados na fase clínica contra os novos alvos moleculares do *T. cruzi*, nos últimos anos. Isto se deve ao baixo nível de investimentos alocados para esta área de pesquisa e à falta de protocolos padronizados para a triagem de novos agentes tripanossomicidas. A seguir encontra-se a relação de novas drogas identificadas neste estudo, e que foram testadas em seres humanos nos últimos anos.

8.1 Alopurinol

Este agente age como um substrato alternativo ao sistema transferase hipoxantina-guanidina phosphoril que bloqueia a síntese de purinas. Gallerano, Mar e Sosa (1990) trataram dois grupos de pacientes com 600 e 900 mg/dia de alopurinol por 60 dias, e fez a comparação destes pacientes com dois outros grupos tratados com nifurtimox e benznidazol. Eles provaram que o xenodiagnóstico tornou-se negativo entre 75-92% em todos os grupos, sendo que a mais baixa toxicidade foi obtida com o alopurinol. Já Apt *et al.* (1998) trataram 104 pacientes crônicos

com 8.5 mg/kg/dia de alopurinol por 60 dias, e monitorou os pacientes com exames clínicos de sorologia, xenodiagnóstico, hemocultura e eletrocardiograma, e foi obtida uma taxa de cura de 44% dos pacientes tratados com alopurinol. Já o grupo de Lauria-Pires *et al.* (1998) realizou estudos com o alopurinol que se mostraram ineficazes durante o tratamento da fase aguda da doença de Chagas.

8.2 Posaconazol

Este inibidor da síntese de ergosterol é um agente antifúngico da classe dos triazóis que foi aprovado para o tratamento de infecções invasivas, por fungos, em humanos. Em um estudo denominado "ChagasazolTrial", conduzido em Barcelona, na Espanha, um grupo de cientistas tratou 3 grupos de pacientes com doença de Chagas crônica; usando uma dose oral de 100 mg de posaconazol, duas vezes ao dia, por 60 dias, em um grupo; usando uma dose oral de 400 mg de posaconazol, duas vezes ao dia, por 60 dias, em outro grupo; e, usando uma dose de 150 mg de benznidazol, duas vezes ao dia, também por 60 dias, no grupo controle, 92% dos pacientes que receberam a dose mais baixa de posaconazol; 81% dos pacientes que receberam a dose mais alta de posaconazol, e 38% dos pacientes que receberam a dose de benznidazol apresentaram testes positivos de rt-PCR para o DNA do *T. cruzi*, durante o período de monitoramento dos pacientes depois do referido tratamento. Em outras palavras, este estudo demonstrou uma eficácia muito baixa do posaconazol para tratar pacientes crônicos com doença de Chagas (MOLINA *et al.*, 2014).

8.3 Itraconazol

Este agente é um derivado imidazólico que possui um amplo espectro de atividade terapêutica contra micoses superficiais e profundas, e é um inibidor da biossíntese de ergosterol. Um grupo de pesquisadores do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, empreendeu um ensaio clínico usando o itraconazol para tratar 18 pacientes crônicos com doença de Chagas. Eles trataram um grupo de 11 pacientes usando 100 mg diariamente em uma única dose tomada após as refeições durante 90 dias. Eles também trataram outro grupo de 7 pacientes usando 200 mg diariamente por 90 dias. Este grupo de pesquisadores deduziu que o itraconazol foi inativo para tratar pacientes crônicos com a doença de Chagas, segundo a metodologia usada por eles (SOUZA *et al.*, 1992).

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doença de Chagas, que no passado era considerada um problema de saúde pública rural da América Latina, agora se transformou em um problema de saúde pública rural e urbano mundial. Em um primeiro momento, isso foi consequência da migração da zona rural para a zona urbana na América Latina. Em um segundo momento, foi consequência da migração internacional produzida pela globalização.

Nos últimos anos, houve um grande avanço do conhecimento sobre a doença de Chagas. O sequenciamento do genoma do *T. cruzi* desvendou muitos caminhos sobre a fisiologia do

parasito, permitindo a descoberta de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos destinados ao combate do parasito.

Muitas drogas foram submetidas à triagem e provaram possuir atividades contra os novos alvos moleculares descobertos no *T. cruzi*. O composto 6, o composto (S)-7 e as defensinas humanas são drogas promissoras a serem testadas na pesquisa pré-clínica e clínica como candidatas a novos fármacos antichagásicos. Entretanto, apenas o composto K777 passou pelos testes pré-clínicos e se encontra pronto para entrar na fase clínica com chances de se tornar um fármaco antichagásico. Os compostos alopurinol, posaconazol e o itraconazol foram testados na fase clínica como candidatos a fármacos antichagásicos. Porém, nenhum deles foi aprovado para entrar no mercado devido à sua baixa eficácia.

As melhores alternativas para ajudar a diminuir o número de pacientes chagásicos, no mundo, atualmente, são a prevenção e o controle da doença de Chagas. Tais alternativas somente serão alcançados por meio do planejamento e melhoria das habitações rurais e urbanas, da conservação da flora e da fauna silvestres, do combate sistemático ao barbeiro, do controle do doador de sangue e do doador de órgãos, do controle da transmissão congênita e da transmissão pelo leite materno, do controle da transmissão oral pela ingestão de alimentos *in natura*, da prevenção dos acidentes de laboratório, do tratamento dos pacientes chagásicos com o benznidazol (o único medicamento no mercado usado na terapia da doença de Chagas), e por meio da divulgação de medidas de controle e prevenção da doença para a sociedade.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, G. *et al.* New Potent 5-nitrofuryl Derivatives as Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Growth. 3DQSAR (CoMFA) Studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 41, n. 4, p. 457-66, 2006.

ANGEL, J. *et al.* Aerobic Glucose Fermentation by *Trypanosoma Cruzi* Axenic Culture Amastigote-like Forms During Growth and Differentiation to Epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 26, n.1-2, p. 1-10, 1987.

APT, W. *et al.* Treatment of Chronic Chagas Disease with Itraconazole and Allopurinol. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Maclean, v. 59, p. 133-138, 1998.

ARIYANAYAGAM, M.; FAIRLAMB, A. Diamine Auxotrophy May Be a Universal Feature of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 111-21, 1997.

BODLEY, A.; SHAPIRO, T. Molecular and Cytotoxic Effects of Camptothecin, A Topoisomerase I Inhibitor, on Trypanosomes and Leishmania. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Baltimore, v. 92, n. 9, p. 3726-30, 1995.

BRAGA, M.; DE SOUZA, W. Effects of Protein Kinase and Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitors on Growth and Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 256, n. 2, p. 209-16, 2006.

BUCKNER, F. *et al.* Potent Anti-*Trypanosoma cruzi* Activities of Oxidosqualene Cyclase Inhibitors. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington DC, v. 45, n. 12, p. 1210-15, 2001.

COURA, J. R.; DIAS, J. P. Epidemiology, Control and Surveillance of Chagas Diseases - 100 years After its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 31-40, 2009. Suplemento 1.

DE MARCHI, A.; CASTILLO, M.; NASCIMENTO, P. New 3-piperonylcoumarins as Inhibitors of Glycosomal Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 12, n. 18, p. 4823-4833, 2004.

DIAS, L. C. *et al.* Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectiva no Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DOCAMPO, R.; SCHMUNIS, G. Sterol Bioynthesis Inhibitors: Potential Chemotherapeutics Against Chagas Disease. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 13, p. 129-130, 1997.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An Insight on Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, Netherlands, v. 2, p. 19-51, 2007.

ENGEL, J. *et al.* Cysteine Protease Inhibitor Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 88, n. 4, p. 725-34, 1998.

ESTEVA, M.; KETTLER, K.; MAIDANA, C. Benzophenone-based Farnesyl Transferase Inhibitors with High Activity Against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 48, n. 23, p. 7186-91, 2005.

FARREL, N.; WILLIAMSON, J.; MCLAREN, D. Trypanocidal and Antitumor Activity of Platinum-metal and Platinum-metal-drug Dual-function Complexes. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 33, n. 7, p. 961-71, 1984.

FOURNET, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; FERREIRA, M. Efficacy of The Bisbenzylisoquinoline Alkaloids in Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Murine Model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, London, v. 13, n. 3, p. 189-95, 2000.

FRASCH, A. Functional Diversity in The Trans-siliadase and Mucin Families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.16, n. 7, p. 282-86, 2000.

GALLERANO, R.; MAR, J.; SOSA, R. Therapeutic Efficacy of Alluporinol in Patients with Chronic Chagas Disease. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Maclean, v. 43, p. 159-166, 1990.

GELB, M.; VAN VOOHRIS, W.; BUCKNER, F. Protein Farnesyl and N-myristol Transferase: Piggy-back Medicinal Chemistry Targets for The Development of Antitrypanosomatid and Antimalarial Therapeutics. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.126, n.2, p. 155-163, 2003.

GONZALES-PERDOMO *et al.* *Trypanosoma cruzi* Proliferation and Diferentiation Are Blocked by Topoisomerase II Inhibitors. **Antimicrobial Agents Chemoterapy**, Washington DC, v. 34, n. 9, p. 1707-14, 1990.

HORENSTEIN, B. A.; PARR, I. B. **Neuraminidase inhibitors**. WO 199006369 A1,31 jul. 1998, 11 fev. 1999.

HUDOCK, M.; SANZ-RODRIGUES, C.; SONG, Y. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* Hexocinase by Bisphosphonates. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washinton, v. 49, n. 1, p. 215-23, 2006.

KEENAN, M. *et al.* Two Analogues of Fenarimol Show Curative Activity in an Experimental Model of Chagas Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 56, p. 10158-10170, 2013.

LALMANACH, G. *et al.* Biotin-labelled Peptidyl Diazomethane Inhibitor Derived from the Substrate-like Sequence of Cystatin: Targeting of The Active Site of Cruzipain, The Major Cysteine Proteinase of *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical Journal**, London, v. 318, p. 395-399, 1996.

LAURIA-PIRES, L. *et al.* Ineficácia do Allopurinol em Pacientes na Fase Aguda da Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 21, n. 2, p. 79, 1998.

MADISON, M. N. *et al.* Human Defensin a-1 Causes *Trypanosoma Cruzi* Membrane Pore Formation and Induces DNA Fragmentation, Which Leads to Trypanosome Destruction. **Infection And Immunity**, Washington, v. 75, n.10, p. 4780-4791, 2007.

MAJUMDER, S. *et al.* Biochemical Evidence of The Presence of Arginine Decarboxylase Activity in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 78, n. 2, p. 371-74, 1992.

MALAFIA, G.; RODRIGUES, A. S. D. L. Centenário do Descobrimento da Doença de Chagas: Desafios e Perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 5, p. 483-485, 2010.

MCKERROW, J. *et al.* Two Approaches to Discovering and Developing New Drugs for Chagas Disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 263-269, 2009. Suplemento 1.

MOLINA, I. *et al.* Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 370, n. 20, p. 1899-1908, 2014.

NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. Protein Kinases as Drugs Targets in Trypanosomes and Leishmania. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1754, n.1-2, p. 151-59, 2005.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

OCHOLA, D.; PRICHARD, R.; LUBEGA, G. Classical Ligands Bind Tubulin of Trypanosomes and Inhibit Their Growth *in vitro*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 3, p. 600-604, 2002.

OLIARO-BOSSO, S. *et al.* Analogs of Squalene and Oxidosqualene Inhibit Oxidosqualene Cyclase of *Trypanosoma cruzi* Expressed in *Saccharomyces Cerevisiae*. **Lipids**, Chicago, v. 40, n. 12, p. 1257-1262, 2005.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine Proteinases and Cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 1, p. 91-104, 2003.

RIVAROLA, H.; PAGLINI OLIVA, P. *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase Inhibitors: Phenothiazines and Related Compounds Modify Experimental Chagas' Disease Evolution. **Current Drugs Targets, Cardiovascular & Haematological Disorders**, Hilversum, v. 2, n. 1, p. 43-52, 2002.

SANCHES-DELGADO, R. *et al.* Toward a Novel Metal-based Chemotherapy Against Tropical Diseases. Enhancement of The Efficacy of Clotrimazole Against *Trypanosoma cruzi* by Complexation to Ruthenium in RuC12 (clotrimazole)². **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 36, n. 14, p. 2041-2043, 1993.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas Disease in Non-endemic Countries: The Role of International Migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 75-85, 2007. Suplemento 1.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas Disease: A Latin American Health Problem Becoming a World Health Problem. **Acta Tropica**, Basel, v. 115, p. 14-21, 2010.

SELSED, M. E.; QUELETTE, A. J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. **Nature Immunology**, New York, v. 6, n. 6, p. 551-7, 2005.

SOUZA, H. B. W. T. *et al.* Avaliação da Atividade Terapêutica do Itraconazol nas Infecções Crônicas, Experimental e Humana, pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 177-180, 1992.

STEPHENS, C.; BRUN, R.; SALEN, M. The Activity of Diguanidino and Reversed Diamidino 2, 5-diarylfurans Versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 13, n. 12, p. 2065-69, 2003.

STOKA, V. *et al.* Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite, *Trypanosoma Cruzi*, by proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 370, n. (1/2), p. 101-104, 1995.

STREICHER, H.; BUSSE, H. Building a Successful Structural Motif Into Sialylmimetics-cyclohexenephosphonate Monoester as Pseudosialosides with Promising Inhibitory Properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 1047-57, 2006.

TOMAZELA, D.; PUPO, M.; PASSADOR, E. Pyrano Chalcones and a Flavone from *Neoraputia magnifica* and Their *Trypanosoma cruzi* Glycosomal Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Inhibitory Activities. **Phytochemistry**, London, v. 55, n. 6, p. 643-651, 2000.

BUTLER, M. W. *et al.* Modulation of Cystatin A Expression in Human Airway Epithelium Related to Genotype, Smoking, COPD, and Lung Cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v. 71, n. 7, p. 2572-2581, 2011.

WILKINSON, S. *et al.* Vitamin C Biosynthesis in Trypanosomes: A Role for The Glycosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Baltimore, v.102, n. 37, p. 11645-50, 2005.

URBINA, J. Lipid Biosynthesis Pathways as Chemotherapeutic Targets in Kinetoplastid Parasites. **Parasitology**, Amsterdam, v. 114, p. 91-99, 1997.

URBINA, J. Chemotherapy of Chagas Disease: The How and The Why. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 77, n. 3, p. 332-38, 1999.

URBINA, J.; DOCAMPO, R. Specific Chemotherapy of Chagas Disease: Controversies and Advances. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 19, p. 495-501, 2003.

URBINA, J.; PAYARES, G.; MOLINA, J. Cure of Short-and Long Term-term Experimental Chagas Disease Using D0870. **Science**, New York, v. 273, p. 969-71, 1996.

Recebido em: 30 jan. 2015.

Aprovado em: 30 mar. 2015.